

## Proporsi dan Karakteristik Spermatozoa X dan Y Hasil Separasi Kolom Albumin

**F. Afiati**

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI

Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911, e-mail : fifiafiati@yahoo.com

(Diterima 16-12-2003; disetujui 15-03-2004)

### ABSTRACT

The objectives of this research was to know the proportion and characteristic of sperm after separated by albumen column technique. To identify the sperm bearing X, Y chromosome, the head of sperm from the fresh semen and the separated sperm were measured by morphometric method. The length and the width of the head sperm from fresh semen (9.21 and 5.10  $\mu\text{m}$ ) were smaller than up fraction (9.68 and 5.44  $\mu\text{m}$ ) and similar with bottom fraction (9.15 and 5.14  $\mu\text{m}$ ). The proportion of X, Y spermatozoa from fresh semen (43 : 57) were significantly different ( $P < 0.01$ ) compare to up fraction (80.88 : 19.12). However, almost similar with bottom fraction (41.80 : 58.82). The motility and sperm plasm membrane intact of spermatozoa from fresh semen were (77.5 and 79.68%) significantly higher ( $P < 0.01$ ) compare to X spermatozoa (70.83 and 62.04%) and also Y spermatozoa (75 and 63.1%). The abnormality of sperm from fresh semen (2.17%) was significantly lower ( $P < 0.01$ ) compare to X spermatozoa (6.32%) and Y spermatozoa (7.91%). These results showed that the sperm after separated by albumen column technique could be used for artificial insemination.

*Key words : sperm plasm, membrane intact, motility, albumin column*

### PENDAHULUAN

Pengontrolan jenis kelamin dapat dimulai dari pengkondisian saluran reproduksi ternak betina agar lebih baik bagi spermatozoa X dari spermatozoa Y atau sebaliknya sampai dengan pemisahan spermatozoa X dan Y sebelum dilakukan IB (inseminasi buatan) atau IVF (*in vitro fertilization*) (Sukra *et al.*, 1989). Pemanfaatan teknologi *sexing* spermatozoa merupakan salah satu pilihan yang tepat dalam rangka peningkatan efisiensi reproduksi yang mampu meningkatkan efisiensi usaha peternak-

an, baik dalam skala peternakan rakyat, maupun dalam skala komersial (Saili *et al.*, 1998).

Pemisahan spermatozoa merupakan upaya untuk mengubah proporsi perolehan spermatozoa yang berkromosom sejenis (X atau Y) dengan metode tertentu, sehingga berubah dari proporsi normal (rasio alamiah), 50% banding 50%. Penelitian yang mengarah pada teknik pemisahan spermatozoa sebelum inseminasi untuk memodifikasi perbandingan jenis kelamin anak yang diproduksi telah banyak dilakukan berdasarkan perbedaan berat jenis, perbedaan muatan listrik dan perbedaan fisiologi dan

biokimia spermatozoa (Saili *et al.*, 1998). Penggunaan putih telur secara umum tanpa membedakan bagiannya (albumin) sebagai medium pemisahan spermatozoa sapi dianggap cukup layak (Saili, 1999). Menurut Maxwell *et al.* (1984), efisiensi usaha dalam mengubah rasio spermatozoa X dan Y dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain konsentrasi BSA, waktu atau lama spermatozoa menembus larutan BSA, dan konsentrasi spermatozoa yang akan dipisahkan dalam cairan pengencer.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui performa spermatozoa sebelum pemisahan dan sesudah pemi-ahan serta mengetahui pemanfaatan albumin dalam menghasilkan proporsi spermatozoa X dan Y yang layak untuk diaplikasikan dalam kegiatan inseminasi buatan.

## MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi dan Genetika Ternak, Bidang Biologi Sel dan Jaringan, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong.

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen sapi Peranakan Ongole (PO), bagian cair putih telur (albumin), medium Brackett-Oliphant (1975), eosin 2%, *phenol red*, penisilin, streptomisin, minyak imersi, alkohol 70%, *aquabidest*, seperangkat alat vagina buatan, gelang karet, corong karet, tabung gelas penampung berskala), tabung pemisah spermatozoa, tabung *centrifuge*, gelas ukur, gelas Erlenmeyer, gelas *beaker*, gelas objek, gelas penutup, pipet Pasteur, hemasitometer, *centrifuge*, mikroskop, kertas lakmus, pemanas bunsen, timbangan elektronik, rak tabung, *water bath*, *magnetic stirrer*, *counter*, dan lain-lain.

### Penyiapan Semen

Metode penyiapan spermatozoa menurut Toelihere (2001) yaitu semen sapi

ditampung menggunakan vagina buatan, kemudian dibawa ke laboratorium untuk dievaluasi secara makroskopis (volume, warna, bau, pH, dan kekentalan) dan mikroskopis (gerakan massa, persentase motilitas, konsentrasi, persentase abnormalitas, dan persentase hidup mati).

### Pemisahan Spermatozoa

Metode pemisahan menurut Saili (1999), yaitu semen sapi yang ditampung (ejakulat) dicuci dengan penambahan medium BO (Brackett-Oliphant) dan disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Medium BO ditambahkan kembali pada endapan semen sampai konsentrasi menjadi 150 juta sel per mililiter. Satu mililiter sampel dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi kolom albumin bertingkat 10% dan 30%, kemudian dibiarkan selama satu jam pada suhu 28° C. Fraksi semen bagian atas dipisahkan dari fraksi semen bagian bawah dengan menyedot masing-masing fraksi menggunakan pipet dan ditampung dalam tabung *centrifuge*, kemudian dicuci menggunakan medium BO dengan sentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit.

### Evaluasi Spermatozoa secara Morfometrik

Preparat ulas spermatozoa dibuat dari masing-masing fraksi semen dengan pewarnaan diferensial menggunakan larutan eosin 2%, selanjutnya pengukuran panjang dan bagian terlebar kepala spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop cahaya pembesaran 10 x 100 dengan menggunakan lensa mikrometer. Jumlah spermatozoa yang dihitung dari masing-masing fraksi adalah 200 sel spermatozoa, yang berukuran kepala lebih besar dari kontrol dikategorikan sebagai spermatozoa X, sedangkan bila ukuran kepala lebih kecil dari kontrol dikategorikan sebagai spermatozoa Y (Saili, 1999).

### Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap. Data yang dihasilkan dianalisis dengan Anova, bila terdapat perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) dilanjutkan dengan uji Fisher's LSD.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Salah satu cara dalam memprediksi spermatozoa X dan spermatozoa Y adalah dengan evaluasi secara morfometrik, yaitu mengukur bagian terlebar dan panjang kepala spermatozoa, seperti terlihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Hasil pengukuran kepala spermatozoa, diperoleh nilai panjang dan lebar fraksi atas lebih besar dibandingkan kontrol, sedangkan fraksi bawah mempunyai nilai yang lebih kecil. Nilai ini sesuai dengan penelitian Saili (1999), yaitu nilai yang lebih besar dari rata-rata (kontrol) digolongkan spermatozoa X, sedangkan yang lebih kecil digolongkan spermatozoa Y. Ukuran kepala (panjang x lebar;  $\mu\text{m}$ ) spermatozoa fraksi atas ( $9,68 \times 5,44 \mu\text{m}$ ) lebih besar dibanding dengan spermatozoa kontrol ( $9,21 \times 5,10 \mu\text{m}$ ) dan spermatozoa fraksi bawah ( $9,15 \times 5,14 \mu\text{m}$ ).

Proporsi spermatozoa X pada fraksi bagian atas (80,88%) berbeda sangat nyata lebih besar ( $P < 0,01$ ) dibanding spermatozoa kontrol (43%) dan fraksi bawah (41,80%). Proporsi spermatozoa Y pada fraksi bagian atas (19,12%) berbeda sangat nyata lebih kecil ( $P < 0,01$ ) dibanding spermatozoa kontrol (57%) dan fraksi

si bawah (58,82%). Herman & Tjokronegoro (1982) memisahkan spermatozoa manusia dengan menggunakan *human serum albumin* (HSA) dalam kolom 10% dan 20%, dan menghasilkan 71% spermatozoa Y pada lapis 10% dan 72,18% pada kolom 20% HAS dengan seks rasio kelahiran anak laki-laki 83% dan anak perempuan 27%. Jaswandi (1992) melakukan pemisahan sperma pada sapi perah menggunakan larutan BSA 6% dan 10%, dan mengungkapkan bahwa inseminasi dengan fraksi semen bagian bawah didapatkan rasio jenis kelamin ternak jantan betina (62,5% : 37,5%), sedangkan inseminasi dengan fraksi semen bagian tengah diperoleh jantan (22,2%) dan betina (77,8%).

Evaluasi semen dilakukan segera setelah proses penampungan. Evaluasi secara makroskopis meliputi warna, pH, bau, konsistensi, dan volume, sedangkan evaluasi mikroskopis meliputi gerakan massa, konsistensi, persentase motilitas, persentase hidup, persentase abnormal, dan presentase membran plasma utuh. Persentase motilitas, MPU dan abnormalitas spermatozoa sebelum pemisahan dan setelah pemisahan dapat dilihat pada Tabel 3.

Motilitas spermatozoa sebelum pemisahan (77,5%) tidak berbeda nyata dengan motilitas spermatozoa Y (75%), tetapi sangat nyata lebih tinggi ( $P < 0,01$ ) daripada spermatozoa X (70,83%). Penurunan terjadi karena pada spermatozoa hasil pemisahan telah mengalami perlakuan yang membutuhkan banyak energi untuk tetap menormalkan kondisi fisiologisnya. Proses pencucian yang berakibat pada pengurangan

Tabel 1. Rataan ukuran kepala spermatozoa ( $\mu\text{m}$ )

Fraksi semen	Jumlah spermatozoa	Ukuran kepala spermatozoa	
		Panjang	Lebar
Kontrol	200	$9,21 \pm 0,56$	$5,10 \pm 0,39$
Fraksi atas	204	$9,68 \pm 0,57$	$5,44 \pm 0,53$
Fraksi bawah	204	$9,15 \pm 0,75$	$5,14 \pm 0,45$

Tabel 2. Persentase spermatozoa yang diprediksi membawa kromosom X dan Y

Fraksi Semen	Jumlah Spermatozoa	Jenis Spermatozoa	
		X	Y
Kontrol	200	43,00 (86/200) <sup>b</sup>	57,00 (114/200) <sup>a</sup>
Fraksi Atas	204	80,88 (165/204) <sup>a</sup>	19,12 (39/204) <sup>b</sup>
Fraksi Bawah	204	41,80 (84/204) <sup>b</sup>	58,22 (120/204) <sup>a</sup>

Keterangan: superskrip berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ )

konsentrasi plasma semen dan menggantinya dengan medium BO dimungkinkan sebagai salah satu faktor yang menyebabkan menurunnya nilai motilitas spermatozoa bila dihubungkan dengan ketersediaan sumber energi bagi spermatozoa, walaupun di dalam medium BO terdapat glukosa (Saili, 1999). Persentase motilitas ini masih dinilai baik karena menurut Toelihere (1993) syarat motilitas bagi pelaksanaan inseminasi buatan adalah 40%.

Energi yang digunakan untuk pergerakan spermatozoa tersimpan dalam bentuk senyawa ATP (Adenosin Triphosphat) dan didukung oleh Hafez (1993) yang menyatakan bahwa salah satu faktor utama yang mempengaruhi motilitas spermatozoa adalah ketersediaan energi ATP. Motilitas spermatozoa Y lebih tinggi dibandingkan motilitas spermatozoa X (75% : 70,83%). Hal ini terjadi karena adanya perbedaan kecepatan spermatozoa X dan Y

dalam menembus larutan albumin. Spermatozoa Y dengan bentuk dan ukuran yang lebih kecil, serta mengandung DNA yang lebih sedikit mempunyai motilitas yang lebih tinggi dibandingkan spermatozoa X (Goodall & Roberts, 1976). Namun demikian keduanya mempunyai motilitas yang lebih tinggi dibanding nilai motilitas yang dihasilkan oleh Saili (1999), yaitu sebesar 64,5 % (spermatozoa X) dan 51 % (spermatozoa Y).

Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sebelum pemisahan (79,68%) sangat nyata lebih tinggi ( $P < 0,01$ ) dibandingkan MPU spermatozoa X (62,04%) dan spermatozoa Y (63,24%). Hal ini terjadi karena spermatozoa X dan spermatozoa Y telah mengalami gangguan fisik dan gangguan kimiawi (Saili, 1999), mengingat medium yang digunakan sebagai medium pemisahan mengandung albumin yang mempunyai peranan penting dalam proses penghilangan kolesterol dan ion zinkum yang berfungsi mensta-

Tabel 3. Motilitas, membran plasma utuh (MPU), dan abnormalitas spermatozoa sebelum pemisahan dan sesudah pemisahan (%)

Parameter	Sebelum pemisahan	Setelah pemisahan	
		Spermatozoa X	Spermatozoa Y
Motilitas	77,50 <sup>a</sup>	70,83 <sup>b</sup>	75,00 <sup>b</sup>
MPU	79,68 <sup>a</sup>	62,04 <sup>b</sup>	63,24 <sup>b</sup>
Abnormalitas	2,17 <sup>b</sup>	6,32 <sup>a</sup>	7,91 <sup>a</sup>

Keterangan: superskrip berbeda dalam baris yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ )

bilkan membran plasma spermatozoa (Dow & Bavister, 1989).

Persentase abnormalitas spermatozoa yang tidak dipisahkan (2,17 %) sangat nyata lebih rendah ( $P < 0,01$ ) dibanding persentase abnormalitas spermatozoa X (6,32 %) dan spermatozoa Y (7,91%). Nilai abnormalitas hasil penelitian masih dalam kisaran normal, karena menurut Toelihere (1993) abnormalitas primer dan sekunder tidak melebihi 20%. Achmadi (2001) menghasilkan persentase hidup 53,44% dan persentase abnormal 31,82% pada spermatozoa beku yang telah dithawing.

### KESIMPULAN

Karakteristik spermatozoa sebelum pemisahan menurun bila dibandingkan dengan karakteristik spermatozoa setelah pemisahan, tetapi penurunan ini masih mempunyai nilai yang layak bagi pelaksanaan inseminasi buatan. Penggunaan albumin mampu memisahkan spermatozoa X dari spermatozoa Y.

Efektifitas usaha dalam perolehan spermatozoa X dan Y dengan kolom albumin dapat diketahui melalui pengujian secara biologis berupa perolehan angka kebuntingan dan perbandingan jenis kelamin anak yang dilahirkan hasil inseminasi dengan masing-masing fraksi semen hasil pemisahan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih disampaikan kepada M. Gunawan, S.Pt. dan Edy S. atas segala bantuannya, terutama pada saat persiapan sampel. Terimakasih juga diucapkan kepada Dra. E. M. Kaiin, M.Si. dan N. D. Yanthi, S.Si. atas segala saran dalam penyempurnaan makalah ini.

### DAFTAR PUSTAKA

**Achmadi, A. S.** 2001. Kaji banding kualitas dan keutuhan membran plasma semen beku sapi pada tiap tahap jalur distribusi. Skripsi.

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

**Brackett, B. G. & G. Oliphant.** 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction* 12:260-274.

**Dow, M. P. D. & B. D. Bavister.** 1989. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. *Gamete Research* 23:351-360.

**Goodall, H. & A. M. Roberts.** 1976. Differences in motility of human X and Y bearing spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 48:433-436.

**Hafez, E. S. E.** 1993. *Reproduction In Farm Animals*. 6th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.

**Herman, R. & Tjokronegoro.** 1982. Pemisahan spermatozoa X dan Y dengan albumin gradient untuk inseminasi buatan guna mampu nyai anak laki-laki. *Medika No. 2*. Tahun 8: 107-110.

**Jaswandi.** 1992. Penggunaan lapisan sus-pensi bovine serum albumin 6 dan 10 persen dalam kolom untuk memisahkan sperma sapi pembawa kromosom X dan Y guna mengubah seks rasio seks pada pedet. Tesis. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.

**Maxwell, W. M. C., G. Mendoza, & I. G. White.** 1984. Postthawing survival of motile ram sperm after isolation by layering on protein column. *Theriogenology* 21:4.

**Saili, T., M. R. Toelihere, A. Boediono, & B. Tappa.** 1998. Pengendalian jenis kelamin anak melalui sexing spermatozoa untuk reproduksi ternak. *Warta Biotek, Th.XII No. 1-2*. Hlm. 1-5.

**Saili, T.** 1999. Efektivitas penggunaan albumin sebagai medium separasi dalam upaya mengubah rasio alamiah spermatozoa pembawa kromosom X dan Y pada sapi. Tesis. Program Pasca Sarjana, IPB, Bogor.

**Sukra, Y., L. Rahardja, & I. Djuwita.** 1989. *Embriologi I*. Depdikbud - Dirjen Pendidikan Tinggi PAU Ilmu Hayat. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

**Toelihere, M. R.** 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Angkasa, Bandung.

**Toelihere, M. R.** 2001. Prosesing dan pembekuan semen serta pemanfaatan semen beku. Pelatihan Transfer Embrio dan Prosesing Sperma. Proyek Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong.